Aus dem Bezirks-Spital Langnau
Chefarzt: Prof. Dr. A. Fonio

Der Einfluß verschiedener gerinnungshemmender Lösungen auf die Evolutionsformen der Thrombozyten

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinisch-zahnärztlichen Fakultät
der Universität Bern

Vorgelegt von
Stefan Mathias Sonder
von Salux (Graubünden)

Bern 1941
Druck von Benno Schwabe & Co.
Basel

Aus dem Bezirks-Spital Langnau
Chefarzt: Prof. Dr. A. Fonio

Der Einfluß verschiedener gerinnungshemmender Lösungen auf die Evolutionsformen der Thrombozyten

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinisch-zahnärztlichen Fakultät
der Universität Bern

Vorgelegt von
Stefan Mathias Sonder
von Salux (Graubünden)

Bern 1941
Druck von Benno Schwabe & Co.
Basel

Auf Antrag des Herrn Prof. Dr. A. Fonio von der Medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 11. Dezember 1940.

Der Dekan der medizinischen Fakultät:
Prof. Dr. *H. Bluntschli.*

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderdruck aus den Helvetica Medica Acta, Band 8, Heft 4, 1941

Die erste Beschreibung der Thrombozyten stammt von *Zimmermann* (1847), der sie im Plasma oberhalb der Erythrozytenschicht angehäuft fand im durch Magnesiumsulfat ungerinnbar gemachten Blut, einzeln oder in Häufchen vorkommend und dann sehr zahlreich. *Georges Hayem* entdeckte 1877 die Spindelzellen beim Frosche, den Thrombozyten der Säugetiere entsprechend, die er Hämatoblasten nannte. Er nahm damals irrtümlich an, daß sie sich in rote Blutkörperchen umwandeln können. Die Spindelzellen besitzen im Gegensatz zu den kernlosen Hämatoblasten der Vertebraten einen Kern. Nach *Hayem* handelt es sich um das dritte Blutelement, kernhaltig bei den Oviparen, kernlos bei den Viviparen. Neben ihrer Rolle bei der Blutgerinnung nahm *Hayem* an, daß ihnen eine zweite Rolle zukomme, der Umwandlung in rote Blutkörperchen.

Bizzozero beschrieb 1882 die dritte Blutzelle, die Blutplättchen, wie er sie benannte, den Hämatoblasten entsprechend. Seine Untersuchungen fanden in vivo bei Betrachtung des Blutkreislaufes in den Mesenterialgefäßen kleiner Säugetiere statt. Er beschrieb erstmals die Agglutinationshäufchen der Plättchen an den endothelgeschädigten Partien der Kapillare, die Vorläufer der Thrombose.

Deetjen und *Dekhuyzen* (1901) brachten die kernhaltigen Hämatoblasten der Oviparen in Beziehung zu den kernlosen der Viviparen, brachten sie in engsten Zusammenhang mit der Gerinnung und benannten sie Thrombozyten. Weitere Untersuchungen über die Thrombozyten stammen von *Nolf*, *Morawitz*, *Bordet*, *Le Sourd* und *Pagniez*. Die Kliniker *Bensaude*, *P. Weil* führten die Irrektraktilität des Koagulums auf Mangel oder auf das Fehlen der Thrombozyten zurück.

Eine ganze Reihe von Veröffentlichungen erschien seither, die von *Leandro Tocantins* (1938) in einer Monographie zusammengefaßt wurden. Die meisten Autoren stellen die Blutplättchen im gefärbten Ausstrichpräparat her.

Die Untersuchung im Dunkelfeld brachte eine Aenderung der Untersuchungstechnik. Es finden sich darüber Angaben bei *Schaeffer* (1938), der bei Betrachtung von Natriumzitratplasma im Dunkelfeld auf die Thrombozyten aufmerksam wurde als einen Nebenbefund bei seinen Untersuchungen. Nach *Schaeffer* sollen sich aus den Thrombozyten die Blutplättchen (?) in mannigfacher Umformung, als Stern-, Haifisch- und Medusenform entwikkeln, die sehr zarte Fortsätze aufweisen, im Flüssigkeitsstrom flottierend.

Vom Holländer *Bosch* (1937) stammt eine Monographie über Untersuchungen der Thrombozyten im Dunkelfeldpräparat. Er beschreibt die

Form, Struktur und das Verhalten der Thrombozyten in bezug auf Glas. Nach *Bosch* weisen normale Thrombozyten immer Ausläufer und eine feingekörnte Struktur auf, Veränderungen der Form und Struktur der Plättchen in reinem unverdünntem Plasma treten nur *durch Abkühlung unter 37°* auf und wenn die Thrombozyten mit Fibrin, Glas und anderen benetzbaren Materialien in Berührung kommen.

Durch Hinzufügen von Stoffen, welche der Gerinnung des Plasmas entgegenwirken, ändern sich nach *Bosch* Form, Struktur und Labilität der Thrombozyten. Sie treten am schnellsten im Magnesiumsulfat-Plasma ein, demnächst im Zitrat-, danach im Natriummetaphosphat-, am trägsten im Oxalat- und gar nicht im Heparin-Plasma. Liquoid Roche zerstört die Plättchen.

Bei Erhöhung der Temperatur auf 37° C treten diese Veränderungen in den genannten Plasmaarten schneller ein, durch Erniedrigung der Temperatur unterbleiben sie ganz oder teilweise.

Bosch untersuchte auch die Resistenz der Thrombozyten in bezug auf Glas sowie die Agglutination in vitro besonders bei Berührung mit Luft; durch Kohlensäure wird die Agglutination nach *Bosch* gehemmt.

Unabhängig von diesen Autoren beschrieb *Fonio* eingehend das Verhalten der Thrombozyten, insbesondere ihre Evolutionsformen im Dunkelfeldnativpräparat, wie sie sich im Verlauf von 12–24 Stunden abwickeln.

Nach *Fonio* kann angenommen werden, daß das Blutplättchen im Kreislauf als runde oder ovaläre Form frei von Pseudopodien kreist. Kurz nach der Entnahme in das Dunkelfeld gebracht, erscheint ein Teil der Thrombozyten als runde oder ovaläre Scheibchen, ein anderer mit kleinen, kurzen, oft abgebogenen Pseudopodien. Hernach macht der Thrombozyt im Verlauf von 24 Stunden charakteristische Evolutionsformen durch: Die Pseudopodien werden allmählich länger und nehmen verschiedene Formen an. Ein Teil ist schlaff, schmal und weist lebhafte peitschende Bewegungen auf, offenbar durch den Flüssigkeitsstrom bedingt, nebst scheinbar eigenen, um die eigene Achse drehenden. Man nimmt bei vielen Zellen kolbige Anschwellungen der Pseudopodien wahr, die bei Längerwerden derselben abnehmen, bei sich verkürzenden dagegen anschwellen, ähnlich einem Schneckenhorn. Bei anderen sind die Pseudopodien doppelkonturiert, vollkommen starr und rötlich aufleuchtend. Die Doppelkonturierung setzt dabei erst bei einem Drittel Distanz vom Zelleib an, weitet sich aus und verjüngt sich nach der Spitze hin zur Nadelform, so daß das ganze Gebilde von Lanzenspitzengestalt ist. Doch stellt sich diese Form nicht immer ein, sie kommt erst einige Zeit nach der Aufbewahrung auf, nicht bei allen Thrombozyten, bei gewissen Fällen dagegen beinahe bei allen Blutplättchen im Gesichtsfeld. Ueber die Ursache dieser Evolutionsform ist man noch nicht im klaren. *Fonio* sah sie besonders ausgesprochen bei zwei Fällen von Hämophilie. Und endlich kommt noch eine dritte Form der Pseudopodienbildung vor, sehr lang, weich erscheinend, mit ausgesprochenen Doppelkonturen, lebhafte oszillierende Bewegungen aufweisend, nebst peitschenden, durch den Flüssigkeitsstrom bedingt. Ihre Länge kann außerordentlich sein, hier und da bis 10mal Zelldurchmesser. Zuweilen werden sie abgestoßen und schwimmen dann im Flüssigkeitsstrom mit schlagartigen Bewegungen frei im Gesichtsfeld herum.

Die Konturen des Zelleibes sind nach *Fonio* scharf markiert, man kann wahrnehmen, wie das Zytoplasma sich in die Pseudopodien fortsetzt und wie die hellauf-

leuchtenden Granula im Protoplasma zerstreut sind, rand- oder zentrumständig, den Kernanteil der Zelle darstellend. Je nach der Ausbildung der Pseudopodien nehmen die Thrombozyten verschiedenartige Gestalten an: Seestern-, Quallen-, Medusen-, Polypen-, Spermatozoen-, sogar Hakenkreuzform u. a. m.

Zunächst schwimmen alle Blutplättchen im Gesichtsfeld herum, sodann setzen sich einige durch die thromboplastische Wirkung des Glases am Grunde des Objektträgers fest und kommen derart besser zur Beobachtung. Man kann dabei zwei Formen unterscheiden: die Reizform mit Pseudopodien, die sich allmählich lebhaft verändern, und die Ruheform, die zu Beginn ausgesprochene amöboide Bewegungen aufweist, die durch die Serienmikrophotographie festgehalten werden können. Die Ruheform ist von mehr oder weniger runder Gestalt, oft sechseckig, oft schmetterlingsförmig mit dornartigen Andeutungen von ganz kurzen Pseudopodien. Der Rand des Zelleibes ist scharf markiert, die Granula rücken meistens nach der Mitte zu, einem Kerne entsprechend. Am Rande finden sich hier und da hell aufleuchtende Punkte vor, eingezogene Pseudopodien darstellend, ähnlich einem Schneckenhorn. Nach einiger Zeit sistieren die amöboiden Bewegungen, die Zelle wird starr und verliert allmählich ihre Konturen, sie löst sich gewissermaßen auf und verschwindet schließlich aus dem Gesichtsfeld.

8–10 Stunden nach der Blutentnahme machen die Reizformen weitere Formveränderungen durch. Die Pseudopodien verlängern sich und weisen oft dichotomische Verzweigungen auf, so daß die Zellen nicht selten eine bezaubernd schöne Sternform annehmen. Zuweilen ist ein Teil der Pseudopodien am Ende dreschflegelartig verdickt. Noch später, nach 12–24 Stunden, verschwimmen die Pseudopodien, nachdem ihr Protoplasma segmentiert erscheint, und nun kann man beobachten, wie das Zytoplasma in Form von Ringen vom Zelleib abgestoßen wird, während die Zellgestalt sich dabei auflöst, nur die Granula bleiben einige Zeit zurück. Man findet oft mehrere Ringe in Abstoßung begriffen, ein Teil schwimmt nach der Loslösung weit ab von der Zelle durch den Flüssigkeitsstrom getragen. Stößt sich das Zytoplasma noch früher ab, beispielsweise unter der Einwirkung von hinzugesetzter Thrombinlösung oder von teilweisen Gerinnungsvorgängen, dann erscheinen die Konturen der Ringe scharf markiert und verdickt, die Ringe selbst können oben und unten eine Delle, ähnlich einem Erythrozyten aufweisen. Diese Ringe weisen zweifellos einen hohen Grad von Klebrigkeit auf, man hat den Eindruck, als ob sie am Zelleib längere Zeit angeklebt bleiben und sich bemühen, abgestoßen zu werden, ein Vorgang, der offenbar durch den Flüssigkeitsstrom vorgetäuscht wird. In diesem Pseudobemühen werden die Ringe dann nicht selten zu elliptischen Gebilden ausgezogen. Man hat des öftern den Eindruck, daß sich kein Ring bildet, sondern ein pseudopodienartig ausgezogenes, doppelkonturiertes Gebilde, das vom Zelleib wegstrebt.

Schließlich zerfällt der Thrombozyt ganz, nur die Granula und etwaige noch vorhandene Ringe zeigen an, daß hier ein Thrombozyt vorhanden war.

Ist die Agglutinationshemmung nicht überall durchschlagend, kommt es zur Bildung von Plättchenhäufchen von 2–4–8 und mehr Zellen. Gewisse Blutarten zeigen eine ausgesprochene Neigung zur Bildung der Häufchen.

Die Thrombozyten rücken dabei zusammen, bei scharfer Einstellung kann man wahrnehmen, wie jedes Plättchen viele kurze Pseudopodien ausstreckt, die sich mit denjenigen benachbarter Plättchen verfilzen und zum fest verklebten Thrombozytenhäufchen führen. Rücken die Thrombozyten infolge der Wirkung der Gerinnungshemmung nicht näher zusammen, kann man durch die Mikrophotographie sehr schön die beschriebene multiple, gegeneinanderstrebende und sich ineinanderverfilzende Pseudopodienbildung darstellen. Setzt man Thrombinlösung zu, dann nimmt man wahr, wie nach erfolgter Bildung eines Fibrinnetzes diese Häufchen Gerinnungszentren bilden und wie sie später der Ringauflösung anheimfallen.

Wesentlich für unsere Untersuchungen ist, daß man mit *Fonio* annehmen kann, daß die Thrombozyten im Kreislauf als mehr oder weniger kreisrunde Scheibchen im Blutstrom zirkulieren, daß sie diesem entnommen zunächst noch teilweise diese Form beibehalten, sich aber allmählich verändern und im Verlaufe von Stunden charakteristische Evolutionsformen durchmachen. Sie sind zunächst frei im Dunkelfeldnativpräparat schwimmend, zu Anfang teils als runde oder elliptische Formen, sodann kurze, abgebogene Pseudopodien ausstreckend, die sich allmählich verlängern und verschiedene Gestalt annehmen können, wie sie von *Fonio* beschrieben wird. Mehr oder weniger lang nach der Beschickung des Dunkelfeldes mit dem auszentrifugierten Plasma macht sich sodann die thromboplastische Wirkung des Glases des Objektträgers geltend, indem ein Teil der Thrombozyten daran anklebt und damit die Evolutionsreihe der charakteristischen Formveränderungen ihren Anfang nimmt. *Fonio* unterscheidet, wie oben erwähnt, eine Reizform und eine Ruheform. Die Reizform ist bereits vor der Anklebung am Glas vorhanden, wird aber bei eingetretener Anklebung ausgesprochener, die Ruheform dagegen ist erst nach derselben sichtbar. Das Blutplättchen nimmt dabei, wie wir bestätigen konnten, eine breite, teils rundliche, teils sechseckige Scheibenform an. In der breiten Protoplasmascheibe der Ruheform rücken die Granula fast immer nach der Mitte zu, einer Kernbildung ähnlich. Der Rand des Protoplasmas ist deutlich abgegrenzt, scharf konturiert und weist bei einzelnen Gebilden scharfe, leicht abgebogene, kurze dornartige Zacken auf, den eingezogenen Pseudopodien entsprechend. Zu Beginn weisen eine Anzahl der Ruheformen charakteristische amöbenartige Bewegungen auf, die im mikroskopischen Bilde festgehalten werden können. Allmählich werden jedoch diese Bewegungen eingestellt, das Thrombozyt verändert seine Gestalt nicht mehr, seine Konturen verwischen sich allmählich und schließlich löst sich das Gebilde auf und verschwindet aus dem Gesichtsfeld. Die Ruheform weist keine Evolutionsphasen auf.

Im Gegensatz hierzu weist die Reizform, wie auch wir nachweisen konnten, im Verlauf von Stunden charakteristische Veränderungen der Konturen auf, wie sie von *Fonio* beschrieben sind: die Protoplasmafortsätze können verschiedene Gestalt annehmen, sie verlängern oder verkürzen sich, wobei eine Anzahl kolbenförmige Verdickungen am Ende aufweisen, die sich verkleinern oder vergrößern, je nachdem sich der Fortsatz verlängert oder verkürzt, ein Teil weist dichotomische Verzweigungen auf, so daß bezaubernd schöne Sternformen zur Bildung gelangen.

Wir konnten bestätigen, daß die Anzahl der Pseudopodien wechselnd ist: von 1–4–5, wodurch mannigfaltige Gestalten der Thrombozyten entstehen. Nach ca. 12 Stunden erscheinen die Pseudopodien segmentiert, was als eine Zerfallserscheinung zu deuten ist, und schließlich löst sich das Gebilde auf. Am längsten erhalten sich die Granula. Bei einem Teil der Thrombozyten stößt sich das Protoplasma in Form von kreisrunden, kleinen Scheibchen ab,

die 2–4 in lebhafter Brownscher Bewegung befindliche Granula enthalten, zum Teil zentrum-, zum Teil randständig. Diese streben vom Blutplättchen ab und schwimmen im Dunkelfeld mit den übrigen Zellen umher. Setzt man etwas Thrombinlösung zu, wird das Fortschreiten der Evolutionsformen beschleunigt, desgleichen das Abstoßen der Protoplasmascheibchen. Ist es zum Gerinnungsvorgang gekommen, bilden die Blutplättchen charakteristische Gerinnungszentren, die Protoplasmakonturen verschwinden, die Granula bleiben im Zentrum bestehen und es beginnt die Abscheidung des Protoplasmas in Form der Scheibchen.

Fonio hat die Beobachtung gemacht, daß die Art der hinzugesetzten gerinnungshemmenden Lösung einen verschiedenartigen Einfluß auf das Entstehen, das Fortschreiten und die Bildung der Evolutionsformen hatte, sowie auf die Ausscheidung der Fibrinnadeln nach Thrombinlösungszusatz.

Mir wurde die Aufgabe gestellt, *den Einfluß der verschiedenen gerinnungshemmenden Lösungen auf die Evolutionsformen zu studieren und die geeignetste Lösung zur Darstellung der Thrombozyten im Dunkelfeldpräparat festzustellen.* Es sollte ferner auch bei einem Teil dieser gerinnungshemmenden Zusätze der Einfluß der Thrombinlösung[1]) auf die Fibrinnadelausscheidung studiert werden. Zu diesem Zwecke benützte ich folgende gerinnungshemmende Lösungen:

	Verdünnungsverhältnis Gerinnungshemmende Lösung Teile	:	Blut Teile
1. Magnesiumsulfat 14% Lösung	2	:	7
2. Natriumzitrat 2%	1	:	10
3. Natriumoxalat 1%	1	:	10
4. Liquemin «Roche»	0,05	:	10
5. Corellilösung:			
Mg hyposulfurosum 1,0			
Glukose 2,0			
Isotonische NaCl-Lösung 10,0	0,8	:	10
6. Hirudin 0,01 g in 1 ccm Kochsalzlösung	0,015	:	10
7. Lösung nach Lenggenhager:			
Na. carb. sicc. 1,25			
Na. phosphoric. sicc. 5,0			
Aq. dest. ad 100	2	:	10
8. Liquoid «Roche»:			
1 g in 100 ccm physiologischer NaCl-Lösung = 1%ige Lösung	1	:	5

[1]) Als Thrombinlösung wurde das von der Ciba auf Veranlassung *Fonios* hergestellte Thrombinpräparat verwendet. Das Thrombin wird als steriles Pulver in Ampullen aufbewahrt in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst (0,3 g Thrombin in 10 ccm Lösung) und ein Tropfen davon an den Deckglasrand verbracht. Allmähliches Durchdringen in das Plasma.

A. Untersuchungstechnik

1. Blutentnahme: Das Blut ist frühmorgens dem nüchternen Patienten zu entnehmen, um keine Chyluströpfchen im Dunkelfeldpräparat zu haben, die hell aufleuchten, sehr störend wirken und die mikrophotographische Aufnahme verunmöglichen.

Die Entnahme kann durch zwei Verfahren geschehen:

1. durch Punktion der gestauten Ellenbogenvene vermittelst der Luerschen Glasspritze.

2. Durch Einstich in die Fingerbeere bei Stauung des Vorderarmes nach Warmwasserbad. *Fonio* hat zu dieser Mikromethode geeignete kleinste Zentrifugiergläschen konstruiert.

Das Blut wird sodann in die Zentrifugiergläschen gegossen, worin die gerinnungshemmende Lösung verbracht wurde.

Zentrifugierung bei ca. 2000 Minutentouren 2–4 Minuten lang.

Es scheiden sich zwei Schichten aus: eine untere, dunkelrote, die Erythrozytenschicht, eine obere hellgelbe, leicht trübe, die Plasma-Blutplättchenschicht.

Die obere wird durch vorsichtiges Ansaugen vermittelst einer mit Gummirohr versehenen Pipette dekantiert und in ein Aufbewahrungsgläschen verbracht.

Ein kleiner Tropfen von diesem Plasma wird auf den Objektträger verbracht. Die Objektträger und Deckgläschen müssen rauchkörnchenfrei sein, entweder werden sie als solche vom Glaslieferanten verlangt oder sie werden mit roher Salzsäure gereinigt.

Nun wird der Tropfen auf dem Objektträger mit dem Deckglas gedeckt und zur Verhinderung der Austrocknung mit Canadabalsam abgedichtet. Herstellung des Dunkelfeldes.

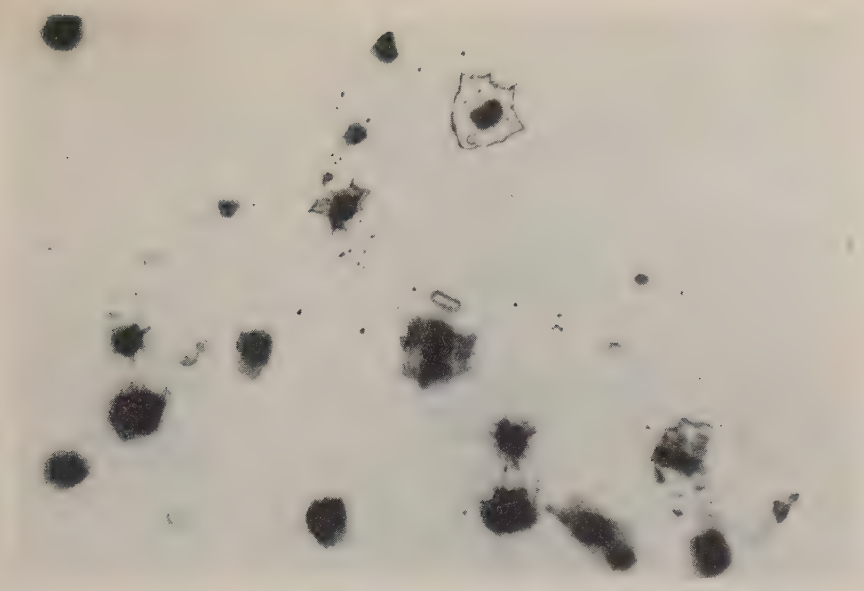
Als Apparatur zu diesen Untersuchungen diente uns nach *Fonio* das neue Zeißmikroskop Stativ LWdE mit mikrophotographischem Wechseltubus und binokularem Wechseltubus Bitumi, das Kompensationsokular 7 ×, die Niedervoltmikroskopierlampe VI, die Aufsetzklammer Miflex, das Photookular 18 ×, eine Klarglasscheibe und die Einstellungslupe 6 ×. Als Zubehör für die Dunkelfeldbetrachtung das Apochromat 60/1,0, die homogene Immersion mit Irisblende und der Kardioid-Dunkelfeldkondensor.

Das Dunkelfeldpräparat wurde während ca. 10 Stunden beobachtet.

B. Untersuchungen mit verschiedenen gerinnungshemmenden Lösungen

1. *Magnesiumsulfat 14%*:

Am Glas fixierte Zellen: Ein Teil der Zellen setzt sich allmählich im Grunde des Objektträgers fest durch die thromboplastische Wirkung desselben bedingt. Die meisten Zellen bewahren die oben beschriebenen Formen von mehr rundlicher Gestalt mit zahlreichen kürzeren und ganz langen Pseudopodien. Ruheformen sind zunächst nur ganz selten sichtbar. Nach 2 Stunden sind die Zellen charakteristische Formen eingegangen. Die Evolution macht sich hier in ausgesprochener Weise geltend. Zellen



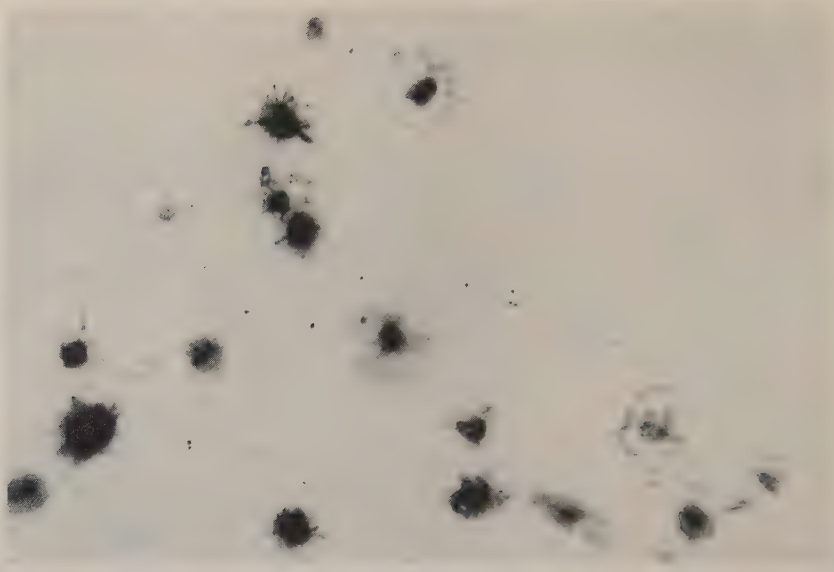
Magnesiumsulfatpräparat (ca. 1500fache Vergrößerung).
Charakteristische Reiz- und Ruheform (links oben): Granula in der Mitte zusammengerückt, breiter Protoplasmasaum. In der Mitte elliptischer Ring, leicht eingedellt mit scharfer Konturierung. Weiter unten rechts Reizform mit zahlreichen feinen Pseudopodien.

mit stark ausgesprochener Pseudopodienbildung von dünner Gestalt, mit teilweiser dichotomer Verzweigung und mannigfaltiger Zweigbildung bis zur Netzform. Stark ausgebildete Reizformen, sehr schöne spinnenartige Formen.

1a. *Magnesiumsulfat + Thrombin* (Präparat Nr. 3765/2 von der Ciba hergestellt). Am Rande des Deckglases wurde Thrombin zugesetzt. Wir erhielten folgende Plättchenbilder: Viele schön erhaltene Plättchen, ein reiches Netz von dünnen Fibrinfäden. Nach 3 Stunden Fibrinmaschennetz, jedoch keine ausgesprochen stark glänzenden Fibrinnadeln (wie z. B. bei Liquemin). Plättchen in starker Reizform zum Teil mit sehr langen dicken Pseudopodien. Granula zusammengerückt, Zelleib erscheint zerkleinert und zusammengeschrumpft. Keine Ruheformen. Plättchen in Fibrinnetz bilden kein typisches Gerinnungszentrum (wie bei Liquemin). Indessen sind sie z. T. zerfallen, die Pseudopodien sind nicht mehr sichtbar, die Granula sind zusammengerückt, nach 3 Stunden nur an einzelnen Plättchen Ringbildung, so daß anzunehmen ist, daß der Zerfall und Abstoßung des Zytoplasmas in Ringform durch die Gerinnungshemmung gehemmt ist.

2. *Natriumzitrat 2%ig:* Schmale Zellen von mannigfaltiger Gestalt, runde Formen, ovale Formen, Keulenform bis längliche Form, überhaupt alle möglichen Formen, mit gut ausgebildeten, kurzen Pseudopodien, die meisten Zellen also in ausgesprochener Reizform. Hie und da eine Fibrinnadel. Nach einiger Zeit sind einige Zellen am Glasrand fixiert. Ein Teil bewahrt ihre bisherige Form, ein anderer Teil nimmt typische Ruheformen an (Granula in der Mitte mit breitem Protoplasmasaum, Rand zum Teil glatt, zum Teil mit spitzen sehr kurzen Pseudopodien, zum Teil stern-, zum Teil schmetterlingsförmig).

Fast alle Plättchen gehen nach einiger Zeit in die Ruheform über.



Magnesiumsulfatpräparat

Ruheform oben im Gesichtsfeld (Reizform gerade darunter, dichotomische Verzweigung der Pseudopodien). Links davon Reizform in Rückbildung begriffen: Pseudopodien eingezogen mit kolbenförmigen Enden. Darunter Uebergang von Reizform in Ruheform, rechts breiter Protoplasmasaum, links noch ausgesprochen Pseudopodien.

2a. *Natriumzitrat + Thrombin:* Zunächst wenig Veränderungen, Ruheformen persistierend, Klumpenbildung, keine Ringe.

3. *Natriumoxalat 1%ig:* Im Blickfeld viele normalgestaltete Plättchen als Reizformen mit kürzeren Pseudopodien und deutlich sichtbare Granula. Die Zelle von mehr oder weniger runder Form, zum Teil schmal-lange Formen mit zweifacher doppelkonturierter Spitze. Alle diese Zellen frei im Gesichtsfelde beweglich nach der Brownschen Molekularbewegung. Nach einiger Zeit sieht man hie und da eine Zelle mit langen Pseudopodien. Die nach einiger Zeit auf dem Glasgrund fixierten Zellen zeigen nach einiger Zeit *beinahe alle die klassische Ruheform:* Granula in der Mitte, kernartig geordnet, Protoplasmasaum breit, von unregelmäßiger Gestalt, bei einer Anzahl von Zellen ohne Pseudopodienbildung, bei einer anderen mit kurzen dünnen Pseudopodien ausgestattet. Es fällt im Präparat auf, daß die meisten fixierten Zellen sehr bald die Ruheform annehmen.

3a. *Natriumoxalat + Thrombin:* Etwa 2 Stunden nach Hinzusetzen des Thrombins gehen von den Plättchenhäufchen aus die Fibrinmaschen das Fibrinnetz bildend. Im Zentrum der Fibrinmaschen die Granula, kein Abstoßen von Protoplasmaringen. Viele Ruheformen. Keine Protoplasmaringbildung, auch einzelne Zellen mit zarten Pseudopodien. (Ringbildung erst nach etwa 3 Stunden, also viel später als wie bei Liquemin.)

4. *Liquemin:* Zu Beginn sehr viele Plättchen, einzelne Plättchen zum Teil von runder bis unregelmäßiger Gestalt, mit meistens sehr kurzen dicken Pseudopodien, sehr deutlich sichtbar, stark leuchtend. Nur ganz wenige Zellen mit längeren Pseudopodien. Später ziemlich viel Klumpenbildung, zunächst keine Ruheformen, alle

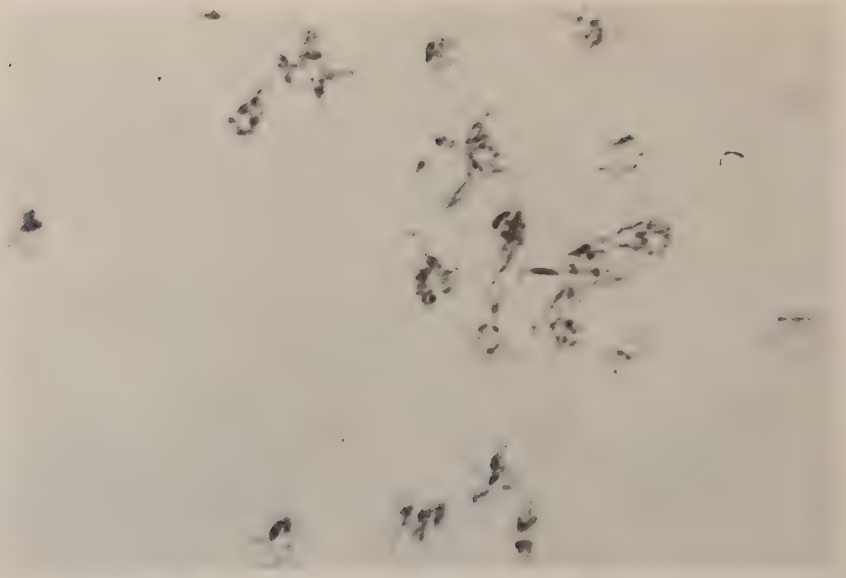
Magnesiumsulfatpräparat
Typische Reiz- und Ruheformen. Bei Ruheform (rechts oben) Granula in der Mitte zusammengerückt, einige noch randständig. Reizformen mit vielen, dünnen, kurzen Pseudopodien, eines davon mit kleiner kolbenförmiger Endverdickung.

Zellen mehr der Reizform entsprechend, Pseudopodien sehr deutlich, Protoplasmasaum der Zellen sehr scharf.

Im Glasgrund fixierte Zellen zum Teil sternförmig, zum Teil schmetterlingsförmig, Granula gegen die Mitte konzentriert, hie und da am Rand des Protoplasmas, Protoplasma breit, Rand deutlich wellenförmig, meistens ohne Pseudopodien. Auch hier ist die Haufenbildung recht häufig bei den fixierten Zellen. Fast alle Zellen mit breitem Protoplasma, ohne Pseudopodien. Zellen mit sehr langen Pseudopodien sind nicht sichtbar.

Es fällt auf, daß die meisten fixierten Zellen im Gegensatz zu den frei herumschwimmenden die Ruheform angenommen haben, mit breitem Protoplasmasaum, meistens ohne Pseudopodienbildung, wenn vorkommend, dann Pseudopodien sehr zart, schmal und meistens sehr kurz.

4a. *Liquemin + Thrombin:* Zunächst lange Zeit keine Veränderung. Nach 1¼ Stunden treten die ersten Fibrinfäden und Fibrinmaschen auf. Von den Plättchenhäufchen gehen die meisten konzentrisch angeordneten Fibrinfäden aus. Dazwischen befindet sich das Fibrinnetz mit weniger dichter Fadenbesetzung. Im Zentrum der konzentrisch angeordneten Fibrinmaschen befinden sich die hell leuchtenden Granula der Blutplättchen. Allmählich wird das Protoplasma der Zelleiber in Form von zahlreichen Protoplasmaringen an die Umgebung abgegeben. Die Fibrinkreise entfernen sich allmählich vom Plättchenzentrum und schwimmen in der Umgebung herum. Der gleiche Vorgang kann an den zahlreichen Plättchen und Plättchenhäufchen in einem Blickfeld, wo keine Fibrinfäden zum Niederschlag gekommen sind, stattfinden. Abgestoßene kreisförmige Gebilde finden sich in den Fibrinmaschen auch abseits der



Corellilösungpräparat
Darstellung der Granula (kleinste Blende, lange Expositionszeit). (Corellilösung nach etwa 3 Stunden.) Granula besonders deutlich sichtbar. Pseudopodien weniger gut sichtbar, zum Teil lang mit dichotomischen Verzweigungen, in der Mitte oben doppelkonturiertes, lanzettförmig.

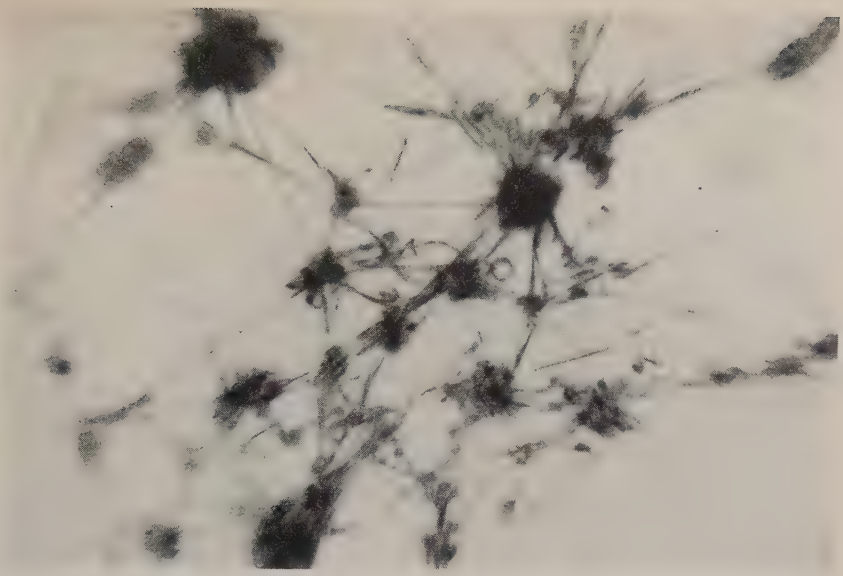
Granulazentren. Vor Beginn der Gerinnung haben fast sämtliche Blutplättchen in fibrinfreien Feldern die Ruheform angenommen mit sehr schön begrenztem Protoplasmarand. Später löst sich das Zytoplasma sämtlicher Zellen in Ringe auf. Diese sind noch zum Teil zusammengruppiert, zu einem andern Teil schwimmen sie frei im Gesichtsfeld herum.

Liquemin + Thrombin nach 4 Stunden: Kreisteilung viel deutlicher geworden, kreisförmige Scheibchen größer, sehr scharf begrenzt, zu Klumpen zusammenhängend, in der Mitte des Kreises mehrere hell leuchtende Granula, 2–3–4–5–6, die meistens randständig angeordnet sind und zum Teil im Zelleib unter lebhafter Bewegung umherfahren. Pseudopodien sind nicht vorhanden, an einzelnen Stellen des Präparates noch zahlreiche Ruheformen nebst einigen Reizformen. An diesen Stellen sind keine Ringbildungen zu sehen. Fibrinnadeln und -netz außer Präparat verschwunden.

5. *Corellilösung:* Pseudopodien kurz. Zellform in den meisten Fällen rund. Die Pseudopodien sind klein und zart, Protoplasmasaum breit, Protoplasma wellenförmig. Granula sehr scharf dargestellt.

5a. *Corelli + Thrombin:* Plättchen mit sehr scharfen Konturen, Pseudopodien zunächst nur wenig verändert, gar keine Neigung zu Klumpenbildung.

6. *Hirudin:* Sehr viele Plättchen zum Teil von runder, ovaler bis unregelmäßiger Gestalt mit gut ausgebildeten Pseudopodien. Granula sehr deutlich sichtbar, stark aufleuchtend. Die meisten Zellen haben 1–2–3 längere Pseudopodien. Im Glasgrund fixierte Zellen zum Teil sternförmig, zum Teil spinnenförmig. Viele Zellen haben im fixierten Präparat die Ruheform angenommen. Klumpenbildung nicht so ausgeprägt wie bei Liquemin.



Liqueminpräparat + Thrombinlösungzusatz
Fibrinnetz mit ausgesprochenen Gerinnungszentren. Plättchenkonturen nirgends mehr sichtbar, aufgelöst. Granula sehr deutlich sichtbar. An mehreren Stellen Ringbildung vom Plättchenzentrum ausgehend und allmählich weitab abgestoßen.

7. *Lösung nach Lenggenhager:* Na. carb. sicc. . . . 1,25
Na. phosphoric. sicc. 5,0
Aq. dest. ad 100,0

Sehr viele Plättchen mit deutlichen Pseudopodien. Die Pseudopodien sind verhältnismäßig kurz und zart. Im allgemeinen wenig Pseudopodien, höchstens 4–5 pro Zelle. Thrombozyten von verschiedenartigster Form, Granula gut sichtbar. In den am Glasgrund fixierten Blutplättchen sind die Granula gegen die Mitte zu konzentriert. Protoplasma breit, Rand wellenförmig mit und ohne Pseudopodien. Die meisten fixierten Zellen nehmen Ruheform an, mit breitem Protoplasma-Saum, meistens ohne Pseudopodien, wenn vorhanden, dann nur kurz und schmal. Man konnte beobachten, daß Pseudopodien sich aneinanderlegten und an der Spitze eine Verdickung bekamen.

8. *Liquoid:* Sehr wenig Plättchen. Die Plättchen haben wenig Pseudopodien, Pseudopodien mittelgroß. Klumpenbildung. Zellen in Ruheform.

Zusammenfassung

Mit allen diesen gerinnungshemmenden Lösungen konnten wir den Thrombozyten als eine Zelle beobachten, die aus dem Zytoplasma und den Granulis besteht. Mit Magnesiumsulfat sahen wir die mannigfaltigsten Bilder: Zellen mit stern-, spinnen-, schmetterlingsförmiger Gestalt, Pseudopodien mit kolbenförmigem, mit dreschflegelartigem Ende, doppelkonturierte Pseudopodien usw., Zellen mit kurzen und langen Pseudopodien, Zellen in

Reizform und in Ruheform. Die Struktur der Zelle ist immer scharf dargestellt. Die Zellen behalten verhältnismäßig lang ihre ursprüngliche Form. Mit Natriumzitrat und Natriumoxalat konnten wir besonders die Ruheformen studieren. Mit Liquemin beobachteten wir ziemlich viel Klumpenbildungen. Mit Liquemin + Thrombin trat schon nach etwa einer Stunde die erste Fibrinnadelausscheidung auf und es konnten die verschiedenen Phasen der Fibrinausscheidung und Fibrinnetzbildung sowie der Vorgänge der Thrombozytenauflösung gut beobachtet werden. Mit Corellilösung ist die Struktur der Zelle auch scharf dargestellt, die Pseudopodien sind alle verhältnismäßig kurz. Bei Hirudin finden sich auch Klumpenbildungen, wenn auch nicht so ausgeprägt wie mit Liquemin. Bei der Lösung nach Lenggenhager wiesen die Zellen durchwegs wenig Pseudopodien bis höchstens vier bis fünf auf, die Pseudopodien verhältnismäßig kurz und zart. Mit Liquoid wenig Pseudopodien, Klumpenbildungen, offenbar wurden die meisten Thrombozyten durch das Liquoid aufgelöst.

In bezug auf die Eignung der gerinnungshemmenden Lösungen zur Untersuchung der Thrombozyten im Dunkelfeldpräparat ergibt sich folgendes:

1. Zur Darstellung der Thrombozyten im Dunkelfeldpräparat eignet sich vor allem am besten die 14%ige Magnesiumsulfatlösung. Die Reizformen und ihre Evolutionen kommen dadurch am klarsten zur Darstellung.

2. Zur Darstellung der Ruheformen eignet sich die 2%ige Natriumzitratlösung, noch besser die 1%ige Natriumoxalatlösung, bei welcher fast keine Reizformen vorkommen. Die Ruheformen sind bei der Natriumoxalatlösung sehr ausgesprochen, neigen mehr zur runden Gestalt und weisen beinahe keine amöboiden Bewegungen auf. Offenbar handelt es sich um ausgesprochen schädigende Einwirkung durch das Oxalat auf die Thrombozyten.

3. Zur Darstellung der verschiedenen Phasen der Ausscheidung der Fibrinnadeln nach Thrombinlösungszusatz, der Fibrinnetzbildung und der Auflösungsvorgänge der Thrombozyten an den Gerinnungszentren eignet sich besonders gut die Liqueminlösung «Roche», wohl infolge ihrer schwächeren gerinnungshemmenden Wirkung.

4. Das Liquoid «Roche» ist zu diesen Untersuchungen wegen seiner auflösenden Wirkung der Thrombozyten gänzlich ungeeignet.

Auf die klinische Anwendung übertragen dürfte sich nach meiner Auffassung das Natriumzitrat von allen diesen gerinnungshemmenden Lösungen, vom Standpunkte der Rückwirkung auf die Thrombozyten aus betrachtet, am besten zur Gerinnungshemmung bei der Bluttransfusion eignen. Das Ueberwiegen der Ruheformen gegenüber den Reizformen dürfte auf eine Herabsetzung der Thrombosegefahr hindeuten.

Bei der blutstillenden Indikation zur Bluttransfusion dagegen ist meiner Ansicht nach das Liquemin «Roche» als gerinnungshemmende Lösung vorzuziehen, einerseits wegen ihres geringeren Grades der Gerinnungshemmung,

andererseits weil die Funktion der Thrombozyten bei diesem gerinnungshemmenden Zusatz, worauf Beobachtungen bei der Fibrinausscheidung hindeuten, offenbar weniger herabgesetzt wird als bei anderen Zusätzen. Doch deutet die häufigere Häufchenbildung der Thrombozyten darauf hin, daß die Gefahr der Thrombosebildung auch klinisch möglicherweise dabei mehr in den Vordergrund tritt.

Baar, H., und *Szekely, L. C.:* Z. Kinderhk. **48,** 31 (1929). – *Bizzozero, G.:* Arch. ital. Biol. **1,** 1, **2,** 345 (1882). – *C. F. L. C. Bosch:* Onderzoekingen over thrombozyten en hunne beteekenis voor der stolling van het bloed. 1937. S. 23–48. – *Corradetti, A.:* Haematologica (It.) **15,** 207 (1934). – *Degwitz, R.:* Fol. haemat. (D.) **25,** 153 (1920). – *Dekhuyzen, M. C.:* Anat. Anz. **19,** 529 (1901). – *Downey, H.:* Fol. haemat. (D.) **15,** 25 (1913). – *Edelmann, A.:* Wien. klin. Wschr. **44,** 795 (1931). – *Ferguson, J. H.:* Physiol. Rev. (Am.) **16,** 640 (1936). – *Fonio, A.:* Die Gerinnung des Blutes. Handbuch der norm. und patholog. Physiologie. Bd. VI, H. 1. Blut und Lymphe; Untersuchung der Thrombozyten im Dunkelfeldnativpräparat. Schweiz. med. Wschr. **69,** 42, 952ff. (1939); Beobachtungen über den Gerinnungs- und den Thrombosevorgang im Dunkelfeldnativpräparat, aus der Sondernummer für Herrn Prof. Louis Michaud. Schweiz. med. Wschr. **70,** 23ff. (1940). – *Fonio, A.*, und *Vanotti:* Neuere Untersuchungen über die Entstehung der Thrombose. Schweiz. med. Wschr. **64,** 48, 1086ff. (1934). – *Hayem, G.:* L'Hématoblaste. Paris 1923. Presses Universitaires de France. – *Kopsch, F.:* Anat. Anz. **19,** 541 (1901). – *Lenggenhager, K.:* Ueber eine neue Methode der Bluttransfusion. Schweiz. med. Wschr. **1933,** 39, 973. – *Perroncito, A.:* Haematologica (It.) **1,** 111 (1920). – *Schaeffer, E.:* Thrombozyten im Dunkelfeld. Fol. haemat. (D.) **61,** 2, 239 (1938). – *Schenker, P.:* Ueber die plättchenbildende Funktion der Megakaryozyten, Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich, 1939. – *Schultz, W.:* Klin. Wschr. **3,** 30 (1924). – *Seeliger, S.:* Fol. haemat. (D.) **29,** 23 (1923). – *Tait, J.:* Quart. J. exper. Physiol. **12,** 1 (1918). – *Tocantins, Leandro:* The Mammalian Blood Platelets in Health and Disease. Medicine (Am.) **17,** 2 (1938); Lit.!; Platelets and spontaneous Syneresis of Blood Clots. Amer. J. Physiol. **110,** 2 (1934). – *Zimmermann:* Ueber die Formgebilde des menschlichen Blutes etc. Rust's Magazin f. d. ges. Heilkunde **66,** 2 (1847).